

Abstract

Project Code: TRG5780070

Project Title: Exploiting the Cre/loxP system to determine a requirement of Tgf- β signaling in Hepatic Stellate Cells during the liver fibrogenesis and regeneration

Investigator: Somyoth Sridurongrit, Ph.D.

E-mail Address: somyoth.sri@mahidol.ac.th

Project Period: 2 years

Abstract:

Development of liver fibrosis is orchestrated by highly proliferative, contractile myofibroblasts (MFs). It is generally believed that MFs are mainly derived from Hepatic Stellate Cells (HSCs) thru the process called the HSC activation. This idea has been supported by data obtained in rodent and human studies showing that there is an increase number of cell expressing generic fibroblast/mesenchyme markers (e.g., FSP-1, vimentin, and nestin) in fibrotic livers. However, it has been shown that these markers are not only expressed by HSCs but also by cells of other origin including hematopoietic and epithelial lineage. In addition, since hepatic MFs are currently known to be potentially derived from bone marrow-derived cells and hepatic epithelial cells, it remains to be determined whether activation of HSCs is an essential process in the generation of collagen-producing MFs and, therefore, a major propeller of liver fibrogenesis *in vivo*. To shed more light on this cellular mechanism of liver fibrosis, this study utilized the Cre/loxP system to abrogate Tgf- β signaling, a key inducer of HSC activation *in vitro*, in HSCs. Here, we report that lack of Tgf- β signaling in HSC led to reduced collagen deposition and decreased number of myofibroblasts in livers of mice treated with thioacetamide (TAA). There was a significant decrease in the expression of pro-fibrogenic factors (Pdgf-A, Pdgf-B and Tgf- β) as well as inflammatory cytokines (Tnf- α and IL-6) in *Alk5/GFAP-Cre* mutant livers. CD3 and myeloperoxidase immunostaining showed a reduction in immune cell infiltration in mutant livers, compared to those of control livers. Associated with reduced fibrosis and inflammation in mutant livers, there was marked attenuation of liver injury, as indicated by serum alanine/aspartate aminotransferase. In conclusion, our results indicate that Alk5-mediated Tgf- β signaling is necessary for the HSC-mediated liver fibrosis and accelerates the response to hepatic damage thru the amplification of liver inflammation.

Keywords : fibrogenesis, HSC activation, Tgf- β signaling, hepatic inflammation, liver damage

บทคัดย่อ

กระบวนการเกิดพังพืด (fibrosis) ถูกควบคุมโดยเซลล์ myofibroblasts (MFs) ที่มีความสามารถในการหดสั้นและมีอัตรา การแบ่งตัวสูง ความเข้าใจในปัจจุบันคือว่า MFs เกิดมาจาก Hepatic Stellate cells (HSCs) โดยผ่านกระบวนการ HSC activation ความเข้าใจนี้มีหลักฐานสนับสนุนมาจากการศึกษาของคนที่และสัตว์ทดลองที่แสดงให้เห็นถึงการเพิ่มขึ้นของ จำนวน MFs ที่วัดจากการแสดงออกของยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ของ fibroblasts เช่น FSP-1 Vimentin และ Nestin ในตับที่เกิดพัง พืด อย่างไรก็ตามนักวิจัยในปัจจุบันพบว่าตัวบ่งชี้เหล่านั้นไม่ได้แสดงออกเฉพาะใน fibroblasts เท่านั้นแต่ยังแสดงออกใน เซลล์เม็ดเลือด (hematopoietic cells) และเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) อีกด้วย นอกจากนี้เนื่องจากเป็นที่ทราบกันแล้วว่า MFs สามารถพัฒนามาจากเซลล์ไขกระดูก (bone marrow cells) และเซลล์เยื่อบุผิว โดยกระบวนการ EMT (Epithelial-to-Mesenchyme Transition) ความเชื่อที่ว่า HSC activation เป็นการกระบวนการหลักที่จำเป็นต่อการสร้าง MFs ระหว่างการ เกิดพังพืดจึงควรได้รับการพิสูจน์และยืนยันอีกครั้ง โครงการนี้ศึกษากลไกการเกิดพังพืดโดยใช้ระบบ Cre/loxP ในการยับยั้ง Tgf- β signaling ที่เป็นตัวเหนี่ยวนำที่สำคัญของ HSC activation ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่าการยับยั้ง Tgf- β ใน HSCs นำไปสู่การลดลงของคอลลาเจนและจำนวน MFs ที่สะสมอยู่ในตับของหนูที่ได้รับสาร thioacetamide (TAA) เรายังพบ อีกว่าปริมาณของสารก่อพังพืด (เช่น Tgf- β Pdgf-A และ Pdgf-B) และสารส่งเสริมการอักเสบ (เช่น TNF- α และ IL-6) ในตับ ของหนู mutant นั้นต่ำกว่าในหนูกลุ่มควบคุม การย้อมเนื้อเยื่อด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CD3 และ myeloperoxidase แสดงให้เห็นว่าเซลล์ T-lymphocytes และ Neutrophils ที่ก่อการอักเสบในตับของหนู mutant มีปริมาณน้อยกว่าปริมาณเซลล์ ก่อการอักเสบในตับของกลุ่มควบคุม การลดลงของการเกิดพังพืดและการอักเสบในตับของหนู mutant นั้นมี ความสัมพันธ์กับระดับการบาดเจ็บที่น้อยลงดังที่แสดงให้เห็นโดยการลดลงของระดับ serum alanine/aspartate aminotransferase (ALT และ AST) ในเลือดของหนู mutant โดยสรุปแล้วผลงานของเราแสดงให้เห็นว่า Tgf- β เป็น signaling ที่จำเป็นต่อกระบวนการเกิดพังพืดและสามารถเพิ่มระดับความบาดเจ็บโดยการส่งเสริมการบาดเจ็บของตับ